第9卷 增刊
1988年11月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.9, Sup.
Nov., 1988

L615细胞双微体DNA的转化研究

刘连瑞 王恢鹏 冯 尚 杨涛兰 冯之凡

（中国科学院遗传研究所，北京）

摘 要

用L615细胞的双微体（DM）转化A9细胞，得到了转化的A9t3细胞系。A9t3 与A9细胞在细胞形态上有显著差异。A9t3 细胞含有双微体，具有较高的抗氨甲喋呤能力，二氢叶酸还原酶活性增加，出现了A9细胞所没有的蛋白质电泳带。

关键词：双微体，A9t3细胞系，肿瘤细胞系

双微体（DM）和均染区（HSR）是肿瘤细胞两种异常的细胞遗传学特征。DM又称为染色体外的细胞核实体(Nuclear entity)(刘连瑞等，1983；1985；Rattner，1984；Schimke，1984）。DM和HSR是二氢叶酸还原酶（DHFR）基因扩增的一种表现，含DM和HSR的细胞对氨甲喋呤（MTX）的抑制作用是抗性的（Milbrandt等，1982)。同时，DM和HSR又携带了癌基因，所以，有DM和HSR的细胞癌基因也扩增了(Chattopadhyay等，1982；Collins等，1983；Schwab等，1983）。

A9细胞系是L细胞系的亚系，该细胞系为异源二倍细胞，染色体平均为55条（Riclard等，1965），已有报道证明A9细胞不含有DM（Georg等，1982）。L615细胞为我们建立一株传代的小鼠白血病细胞株（宁益华等，1982），该株细胞含DM（刘连瑞等，1983）。该细胞染色体为39条，有一条亚中着丝点大染色体和615白血病小鼠的Bj染色体。本文报道L615细胞的双微体DNA转化A9细胞，使转化的细胞向癌化发展。

材料和方法

1.双微体和双微体DNA的提取

在L615细胞对数生长期，按每毫升细胞悬液加0.05微克秋水仙碱，继续培养5小

*国家自然科学基金委员会资助项目。
本文1987年9月9日收到，同年11月2日修回。

时，以1,000rpm离心收集细胞，按刘连瑞等人方法提取双微体。

把双微体悬于100mM NaCl，100mM Tris-HCl (pH8.0)，10mMEDTA，0.5% SDS缓冲液中。成胶粘状溶液再按100毫升溶液加5毫克蛋白酶K，放37°C过夜。溶液加入等体积的水饱和的酚，离心分相。水相在上述不含SDS的缓冲液中透析24小时。透析后加RNase(RNase经100°C预处理，按每毫升加5微克)，在37°C反应12小时，再用酚抽提三次，再透析。最后加两倍体积的冷乙醇，沉淀的DNA溶于转化混合液中(HEPES10克，NaCl 16克，KCl 0.74克，$Na_2HPO_4.H_2O$ 0.25克，dextrose 2克，溶于1,000毫升水中，pH为7.05)。

2.细胞转化

每毫升含5微克DNA的转化混合液加入灭菌的$CaCl_2$溶液，混合液中钙离子浓度为0.125M，在室温放置20分钟，DNA形成乳白色悬浊液。

取生长旺盛的A9细胞，用0.08%胰蛋白酶和0.015%EDTA消化，离心收集细胞，用Eagle's培养液洗两次，把细胞与DNA悬浊液混合，在室温放置15分钟，加0.5毫升处理过的细胞于3毫升Eagle's培养液中，在37℃，5%二氧化碳湿润培养箱中培养5小时。培养结束后吸除培养液，在细胞培养平皿中加25%灭菌甘油3毫升，在室温放置1分钟，然后加新鲜的Eagle's培养液，10%小牛血清，在上述二氧化碳培养箱中培养，上述过程在无菌室内进行。

实验结果

取0.5毫升（8×10^6细胞/毫升）细胞悬液加到3毫升鲜配的Eagle's培养液中，置于5厘米直径培养平皿中，37℃，5%二氧化碳培养箱中培养10天，每个培养皿平均形成34.3个细胞集落，转化频率为4.3×10^{-6}。

选择抗氨甲喋呤（MTX）的细胞

由已形成细胞集落的培养平皿吸除原培养液，换成含0.01μM（$1\times10^{-8}M$）浓度的MTX培养液，继续培养5天，细胞群落能够正常生长，对照A9细胞在同样条件下全部死亡。进一步提高MTX浓度至$2\times10^{-8}M$，5天后，选出四个生长旺盛的细胞集落，分别编号为A9t3、5、7、8。把四个细胞系分开培养，逐步增加MTX浓度。当MTX浓度为$1\times10^{-7}M$时，A9t3和A9t7具有抗性，当MTX浓度为$1\times10^{-6}M$时，只有A9t3细胞能够正常生长，A9t3是保持对MTX有较高抗性的细胞系。

转化细胞系的细胞形态

A9t3细胞在含氨甲喋呤的培养液中经12个月的连续传代培养，其细胞形态与A9细胞有明显差异。A9细胞是多角形整齐的细胞（图1A）转化的A9t3细胞在选择初期为短梭形(图2A)。通过抗性选择，转化的A9t3出现了两种形态。一是长梭形（图2B）；另一种是近园形有角细胞（图2C）。这种细胞形态变化提示在转化过程中细胞发生了某些变化。

转化细胞的双微体观察

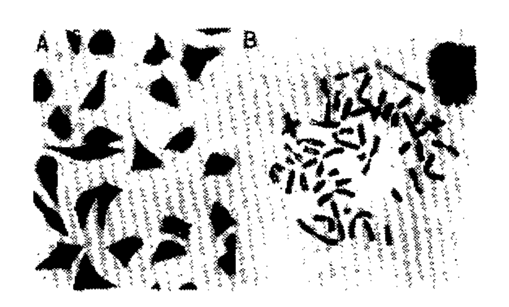


图1　A9细胞形态和染色体图。A．A9 细胞形态图。B．A9细胞染色体图。
Fig. 1. The morphology (A) and metaphase (B) of A9 cell line.

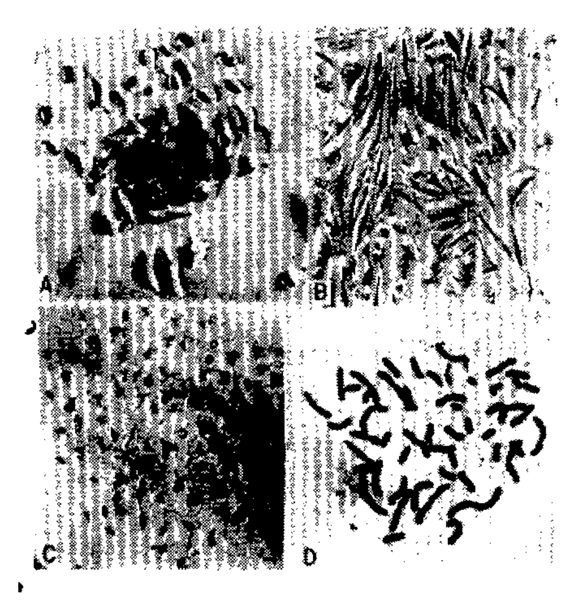


图2　转化的A9t3细胞。A．转化细胞早期形态。B和C是A9t3细胞的两种不同形态。这些图是活细胞相差显微镜图。D是A9t3细胞染色体图，从图中可以看到双微体颗粒。
Fig.2. the transfomated A9t3 cells. A. the morphologies of early period of A9t3 cells. B and C. The different cell morpholgies of A9t3 cells in later period. D. The metaphase of A9t3 cells. The chromosomes and DMs were showed in this picture.

我们观察了100个A9t3细胞分裂相，其中20个分裂相进行了核型分析。发现A9t3细胞含有双微体(图2D)，每个细胞含DM数量从10对到60对不等，这DM在A9细胞中没有发现过（图1B）

转化细胞的蛋白质分析

对A9和A9t3细胞我们进行了全蛋白质电泳分析，从12% SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳图中可以看出（图3），两种细胞的蛋白质图谱不完全一致，图中箭头1、3所标明的电泳条带在转化的A9t3细胞中比A9细胞含量高，箭头2所指出的电泳条带在A9t3细胞中存在，而A9细胞则完全缺失，这可能是经DM-DNA转化，DM所带基因表达的产物。

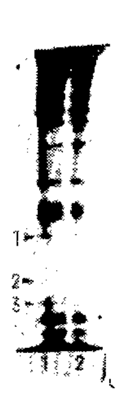


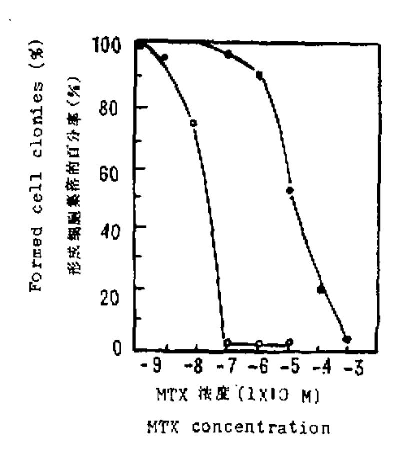
图3　A9t3和A9细胞蛋白质电泳图。12%SDS—聚丙烯酰胺凝胶在Tris—甘氨酸缓冲液系统中，以20mA电泳10小时。样品蛋白质浓度为1 mg/ml，加入10μl样品。凝胶用银染法染色、1.A9t3 细胞蛋白质；2.A9细胞蛋白质，箭头1、2、3是两种细胞有差异的蛋白质条带。

Fig. 3. Electrophoresis of A9t3 and A9 cells proteins. The proteins were electrophoresized on SDS-12% polyacrilamide gel in Tris-Glycine buffer system. The electrophoresis was carried at 20 mA for 10 Hrs. The protein concentration was 1mg/ml and 10μl example was applied. 1. A9t3 cells protein; 2. A9 cells protein. The arrows 1, 2, 3 indicate differential protein bands of A9t3 and A9 cells.

转化细胞抗MTX的抗性测定

旺盛生长的培养细胞收获后，用培养液把细胞稀释成1,500个细胞/毫升，每个培养皿中加10毫升细胞悬液，培养液中MTX浓度从1×10^{-9}递增到$1\times10^{-3}M$，在37℃，5%二氧化碳湿润培养箱中培养4小时，然后换成无MTX的新鲜培养液，继续培养5天。培养结束后，平皿内的细胞集落被固定，用Giemsa染色，计算细胞集落形成的数量，结果列入下表和图4中。

从表1和图4中可以看出A9t3细胞在MTX浓度为$1\times10^{-7}M$时，形成细胞集落的能力为96.7%，而A9细胞在这个浓度时已基本死亡，不能形成集落。在$1\times10^{-6}M$时A9t3细胞形成集落的能力为88.3%。甚至在MTX $1\times10^{-4}M$浓度时A9t3仍有20%多的细胞形成集落。而A9细胞在$1\times10^{-7}M$浓度以上时已全部死亡。转化的A9t3细胞对MTX抗性比对照A9细胞提高了1,000倍以上。



4. A9t3和A9细胞对氨甲蝶呤的抗性测定

●——●A9t3细胞，○——○A9细胞。

Fig. 4. Resistant ability test of A9t3 and A9 cells to methotrexate

●——●A9t3 cells, ○——○A9 cells

表1.　　细胞抗MTX抗性测定

MTX浓度 (*M*)	A9t3 细胞		A9 细胞	
	集落数（个）	占对照的（%）	集落数（个）	占对照的（%）
0	6,000	100	7,484	100
1×10^{-9}			7,232	97.3
1×10^{-8}			5,820	77.8
1×10^{-7}	5,800	96.7	0	0
1×10^{-6}	5,300	88.3	0	0
1×10^{-5}	3,040	50.7	0	0
1×10^{-4}	1,240	20.7		
1×10^{-3}	0	0		

• 空格为未测定浓度，0为在该浓度没形成细胞集落。

讨　　论

肿瘤细胞中存在着基因扩增，双微体是肿瘤细胞基因扩增的主要形式之一。有报道证明双微体是一种环状结构（Marinello等，1982）。双微体在细胞中是否连续存在？如果和染色体一样连续存在，那么，它以什么方式由亲代细胞传到子代细胞。这些问题

还在探索中。最近有研究表明（Rattner等，1984）细胞群体中含DM的细胞数是比较稳定的，能够连续传递。但是，DM的传递方式有待深入研究。

我们用L615细胞的双微体DNA转化A9细胞，得到A9t3 转化细胞系，这个细胞系的细胞形态发生了显著变化，转化的细胞中含有双微体，对氨甲喋呤的抗性提高了，说明转化细胞中二氢叶酸还原酶活性增加。转化的A9t3细胞中出现了A9 细胞所没有的蛋白质电泳条带。DM是二氢叶酸还原酶基因和癌基因的一种扩增形式（Chattopadhyay等，1982，Schwab等，1983）。所以，转化的细胞应该有这两类基因表达产物。

参 考 文 献

刘连瑞等 1983 科学通报 17：1065—1067。

———1985 遗传学报 12：243—248。

宁益华等 1982 遗传学报 9：1—7。

Chattopadhyay. S. K., *et. al.*, 1982, *Nature* 298：361—363.

Collins. S. J. , Groudine. M. T., 1983, *Genetics*, 80：4813—4817.

George. D. L. , powers. V. E., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79：1597—1601.

Marinello. M. J. , Leven. A., 1982, *Hereditas*, 96：39—48.

Milbrandt. J. D. , *et. al.* , 1983, *Mol. Cellular. Biol* 3：1274—1282.

Rattner. J. B. , Lin. C. C., 1984, *Cytogenet. Cell. Genet* 38：176—181.

Riclard. L. D, Ephruss. B., 1965, *Nature* 205：1170—1171.

Schimke. R. T. , 1984, *Cell* 37：705—713.

Schwab. M. A. , *et. al.*, 1983, *Nature* 303：497—501.

STUDY ON TRANSFORMATION OF DOUBLE MINUTE CHROMOSOME DNA OF L615 CELLS

Liu Lianrui　Wang Huipeng　Feng Shang
Yan Taolan　Feng Zhifan
(The Institute of Genetics, Academia Sinca, Beijing)

The gene amplification has been found in number of tumor cell lines and tumor cells. The amplification is related to chromosomal aberrations, including DMs and HSRs. Marinello reported that the shape of double minutes (DM) were usually ring-like.

In this study, we reported that the A9 cell line were transformed by DNA from double minute chromosome of L615 cells. The transformed cell line, A9t3, was obtained after selection under condition culture medium. The morphology of A9t3 cells was obviously changed. There are much more double minute chromosomes in A9t3 cells. The resistant ability of A9t3 cells to methotrexate was increased. A new protein band appeared in A9t3 cells, which was not found in A9 cells. According to above results we proposed that the methotrexate resistance in cultured cells tend to generate amplified DHFR and oncogenes on double minute chromosomes. The transformated A9t3 cells have two kinds of protein products of DHFR gene and oncogene.

Key words: Double minutes, A9t3 cell lene, Tumor cell lines